

T細胞の機能制御メカニズムに関する研究

著者	太田 明夫
号	246
発行年	1997
URL	http://hdl.handle.net/10097/15538

氏 名 (本籍) ^{おお}太 ^た田 ^{あき}明 ^お夫

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 薬 博 第 2 4 6 号

学位授与年月日 平 成 10 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研究科専門課程 東北大学大学院薬学研究科
(博士課程) 薬学専攻

学 位 論 文 題 目 T細胞の機能制御メカニズムに関する研究

論文審査委員 (主 査)
教授 大 内 和 雄 教授 山 添 康

教授 寺 崎 哲 也

論文内容要旨

生体防御機構の一つとしての免疫系は、個体の存続を脅かす微生物やウイルス感染、異物の進入に対抗する重要な役割を担っている。免疫系の作用メカニズムには、抗体や補体が重要な役割を果たす体液性免疫と、標的細胞とエフェクター細胞の直接的な相互作用による細胞性免疫が知られている。T細胞の中でも cytotoxic T lymphocytes (CTL) は細胞性免疫における主要なエフェクター細胞であり、一方、CD 4⁺ ヘルパー T細胞 (Th 細胞) は体液性免疫、細胞性免疫の双方の活性化を制御している。本研究は、CTL および lymphokine-activated killer (LAK) 細胞の標的細胞傷害機構、Th 細胞から産生されるサイトカインとマウス系統差との関連性、ならびに Th 細胞の移入による免疫学的体質の外部からの制御に関して解析を行ったものである。

第1章 LAK 細胞の細胞傷害活性におけるフォルボールエステル感受性 protein kinase C (PKC) アイソフォームの役割

CTL による細胞傷害作用には複数のメカニズムが知られている。それは perforin 等の細胞傷害エフェクター分子の放出であり、また CTL の発現する Fas ligand (FasL) と標的細胞の Fas 抗原との相互作用によるアポトーシスの誘導である。これらのメカニズムを介する細胞傷害活性の発現には PKC の関与が必要であることが報告されている。現在 PKC には11種以上のアイソフォームが知られており、そのうち phorbol ester に感受性の PKC アイソフォームは、細胞を phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA) で長時間処理することで消失する。この現象を利用して、2つの細胞傷害メカニズムに対する PKC アイソフォームの関与について検討した。

C57BL/6 マウス脾細胞を IL-2 (2000U/ml) 存在下で4日間培養することにより誘導した LAK 細胞は、標的癌細胞に対する強い傷害活性を持っていたが、あらかじめ PMA で24時間処理するとその細胞傷害活性は大きく減弱し、細胞傷害エフェクター分子放出の指標である serine esterase (SE) 放出も消失した。このような細胞傷害活性および SE 放出の抑制は PKC 阻害薬である GF109203X によっても引き起こされることから、これらの現象に対する PKC の関与が示唆された。LAK 細胞中の各々の PKC アイソフォームの存在状態をウエスタンブロットによって解析すると、PMA 処理により PKC- α , γ , ϵ , θ が消失したが、PMA 非感受性の PKC- λ , ζ は全く減少しなかった。以上の結果から、PMA 処理による細胞傷害活性、SE 放出の抑制の原因は PMA 感受性 PKC アイソフォームの down regulation であると考えられ、これらの PKC アイソフォームが perforin を介する細胞傷害活性の発現に必要であることが示唆された。

次に Fas-FasL の相互作用を介する細胞傷害活性に対する PMA 処理の影響を調べた。Fas を発現しない L5178Y 細胞に対する LAK 細胞の傷害活性は、24時間の PMA 処理によって完全に消失したが、L5178Y 細胞のマウス Fas 遺伝子トランスフェクタントである A1 細胞に対する傷害性は PMA 処理によって阻害されなかった。C57BL/6-perforin ノックアウトマウス由来 LAK 細胞の L5178Y 細胞に対する

傷害性はほとんど見られなかったが、A1細胞には傷害性を示し、それはPMAで24時間処理しても減少しなかった。これらの結果より、Fas依存的な細胞傷害活性の発現にはPMA感受性PKCアイソフォームは必要ではないと考えられる。

LAK細胞の細胞傷害エフェクター分子の放出、およびFas-FasLの相互作用という2つの細胞傷害機構は、24時間のPMA処理によって区別して考えられることが明らかになり、その差がPMA感受性PKCアイソフォームへの依存性の違いに基づくものであることが示唆された。

第2章 IL-4産生能のマウス系統差とその非MHC遺伝子支配

近年、Th細胞の中にはサイトカイン産生パターンが明らかに異なるTh1、Th2細胞という亜集団が存在することが発見され、それぞれの産生するサイトカインを通じて、Th1細胞は細胞性免疫を促進し、Th2細胞は体液性免疫を活性化することが見出されている。最近では、生体内の免疫機能の恒常性はTh1型免疫とTh2型免疫の間のバランス(Th1/Th2バランス)によって保たれるものと考えられている。C57BL/6マウスとBALB/cマウスにおいて見られるような免疫応答の系統差は、遺伝的なTh1/Th2バランス調節因子の存在を示唆している。この未知の因子の解明を目的とし、BALB/cマウスとC57BL/6マウスのT細胞を抗CD3抗体で刺激した際のサイトカイン産生能の比較を行った。

脾細胞を抗CD3抗体で刺激した時の増殖能及びIFN- γ 産生量にBALB/c、C57BL/6の両マウス間で差は見られなかったが、Th2型免疫誘導のキーサイトカインであるIL-4およびIL-10の産生に関しては、BALB/cマウスの脾細胞の方がC57BL/6マウスの脾細胞よりも多く産生した。BALB/c、C57BL/6両マウスのCD4⁺、CD8⁺T細胞だけがIL-4産生能を調べたところ、BALB/cマウスのCD4⁺T細胞だけがIL-4を多く産生した。したがって、BALB/cマウス、C57BL/6マウス間のIL-4産生能の差は、CD4⁺T細胞の機能的差異に起因するものと考えられた。

BALB/cマウスとC57BL/6マウスのF1であるCBF1マウスのCD4⁺T細胞も、BALB/cマウスと同レベルの高いIL-4産生能を示した。さらに、CBF1 x C57BL/6バッククロスマウスにおいてはIL-4およびIL-10産生の高いグループと低いグループに大別されたが、その産生レベルは広い範囲に分布していた。このことは、BALB/cマウスのもつIL-4およびIL-10の高産生能は遺伝的に優性であり、おそらく複数の遺伝子によって制御されていることを示唆している。また、この制御を行っている遺伝子がMHC遺伝子と関連しているかどうかを調べるために、BALB/c(H-2^d)、C57BL/6(H-2^b)、CBF1(H-2^{b,d})マウスの他にBALB(H-2^b)、B10.D2(H-2^d)マウスのCD4⁺T細胞のIL-4産生能を検討した。BALBマウスがIL-4を多く産生した一方、B10.D2マウスのIL-4産生能は非常に低く、IL-4高産生能は非MHC遺伝子によって制御されていることが強く示唆された。

以上より、BALB/cマウスにおいてCD4⁺T細胞はIL-4、IL-10といったTh2型サイトカインを高レベルで産生し、BALB/cマウスのTh2型免疫応答を起こしやすいという遺伝的な素質に重要な関わりを持つ細胞である可能性が示唆された。

第3章 遺伝的に支配された BALB/c マウスの Th 2 型免疫への偏向性とそれに対する IL-4 産生 V β 8.2⁺ CD 4⁺ CD62L⁻ CD45RB⁻ T細胞の関与

前章で述べたように、BALB/c マウスの CD 4⁺ T細胞は IL-4 を多く産生する。免疫反応初期の Th 2 細胞への機能分化には IL-4 が必要であると考えられており、したがって、BALB/c マウスの CD 4⁺ T細胞は免疫反応の初期の段階での IL-4 産生により、BALB/c マウスの Th 2 型免疫への偏向に関わる細胞である可能性が考えられた。そこで、この IL-4 産生細胞について詳細な解析を行った。

FACStar を用いた細胞の分離により、BALB/c マウスの IL-4 産生細胞は主に CD 4⁺ CD62L⁻ CD45RB⁻ のメモリータイプの T細胞であることが明らかになった。最近、C57BL/6 マウスの IL-4 産生細胞として NK1.1⁺ T細胞 (NKT 細胞) が見出されている。この NKT 細胞は IL-2 R β ⁺ LFA-1^{high} TC R^{int} であるとされており、IL-2 R β ⁻ LFA-1^{high} TCR^{high} である CD 4⁺ CD62L⁻ CD45RB⁻ T細胞はこれと異なっている。さらに、CBF1 マウスを用いて解析を行ったところ、NKT 細胞は NK1.1⁺ TCR^{int} Ly-6 C⁺ IL-2 R β ⁺ あるのに対し、CD 4⁺ CD62L⁻ CD45RB⁻ T細胞は NK1.1⁻ TCR^{high} Ly-6 C⁻ IL-2 R β ⁻ であった。したがって、CD 4⁺ CD62L⁻ CD45RB⁻ T細胞は NKT 細胞とは異なる種類の IL-4 産生細胞であることが示唆された。

その中でも、TCR V β 8.2⁺ CD 4⁺ CD62L⁻ CD45RB⁻ T細胞は V β 8.2⁻ の T細胞よりも高い IL-4 産生を示した。C57BL/6 マウスにも BALB/c マウスと同頻度で V β 8.2⁺ CD 4⁺ CD62L⁻ CD45RB⁻ T細胞が存在するが、IL-4 産生は低く、CD 4⁺ CD62L⁻ CD45RB⁻ T細胞の質的な違いが BALB/c, C57BL/6 両マウス間の IL-4 産生能の差の原因と考えられた。ジャームフリーの BALB/c マウスから得た CD 4⁺ CD62L⁻ CD45RB⁻ T細胞も高い IL-4 産生を示し、BALB/c マウスの IL-4 高産生能は感染など外部からの抗原に関連したものではなく、BALB/c マウスの生体内環境に起因する未知のメカニズムによって成立したものであることが示唆された。以上より、CD 4⁺ CD62L⁻ CD45RB⁻ T細胞の IL-4 産生細胞への機能分化が BALB/c マウスで起こり、C57BL/6 マウスで起こらないことが、生体内 Th 1/Th 2 バランスの系統差となって現れている可能性が考えられる。

第4章 抗原特異的 Th 1, Th 2 細胞の移入による生体内 Th 1/Th 2 バランスの制御

Th 1 主導の免疫応答は数々の炎症性自己免疫疾患に、Th 2 はアトピー性疾患の発症に関与することから、生体内 Th 1/Th 2 バランスの破綻が免疫病発症の原因であるとする考え方が提唱されている。マウスの免疫病発症には遺伝的に決定されている素質が密接に関連するものと考えられ、ヒトにおいても同様の免疫学的な体質の差は存在するものと想像される。生体内の Th 1/Th 2 バランスを外部から手を加えることによって調節できるならば、免疫疾患の治療に大変有用である。そこで、生体内 Th 1/Th 2 バランス操作の試みとして、抗原特異的な Th 1, Th 2 細胞の移入による免疫バランスの変動について検討した。

抗原特異的な Th 1, Th 2 細胞は、ovalbumin (OVA) 特異的な T cell receptor トランスジェニックマウスの脾細胞を、Th 1 の場合は IL-12 と抗 IL-4 抗体、Th 2 の場合は IL-4 と抗 IL-12 抗体の存在下で

抗原 (OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド) と共に培養することによって得た。この Th 1, Th 2 細胞は, OVA₃₂₃₋₃₃₉ の再刺激に対して Th 1 は高い IFN- γ 産生を示したが, IL-4 を全く産生せず, 逆に Th 2 はいくらかの IFN- γ 産生を伴うが, 高い IL-4 産生を示した。

あらかじめ 2×10^7 個の Th 1 細胞を移入しておいた BALB/c マウスでは抗原 (OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチド) の足蹠投与に対して明らかな DTH 反応が起こっており, それはわずかな腫脹が認められただけの Th 2 移入群よりもかなり強いものであった。Th 1 細胞移入マウスにおいてのみ, DTH 反応の際の血清中 IFN- γ 量の上昇が観察された。また, この DTH 反応は抗原特異的な Th 1 細胞に依存的なものであることが確認された。

DTH 反応後のマウス脾及び膝窩リンパ節細胞を OVA₃₂₃₋₃₃₉ ペプチドで刺激した際のサイトカイン産生能を調べたところ, Th 1 細胞を移入したマウスの細胞は大量の IFN- γ を特異的に産生し, Th 2 を移入したマウスの細胞は IL-4 を産生した。BALB/c マウスは Th 2 型の免疫応答に偏りやすいマウスであるが, Th 1 細胞の移入によって抗原に対して IFN- γ を産生し, Th 1 型の免疫応答である DTH 反応を発現するようになった。さらに Th 1 細胞を移入してから 3 ヶ月後のマウスから得られた脾細胞は, 依然として IFN- γ を特異的に産生することが明らかになり, 一旦 Th 1 細胞を移入すると, その後脾細胞は長期間にわたって Th 1 型のサイトカイン産生を行うことが示唆された。この結果は, 細胞移入が生体内 Th 1/Th 2 バランスの偏向に有効な手段であることを示唆している。

本研究により, 以下の点が明らかになった。(i) 細胞障害活性の中でも perforin を介するメカニズムは PMA 感受性 PKC アイソフォームに依存的であるのに対し, Fas-FasL を介するメカニズムは非依存的である。(ii) BALB/c マウスの IL-4 高産生能は遺伝的な因子によって制御されており, IL-4 産生細胞として CD4⁺CD62L⁻CD45RB⁻T 細胞が存在する。(iii) 抗原特異的な Th 1 細胞の移入により BALB/c マウスを Th 1 型の免疫状態にすることが可能である。

審査結果の要旨

CD 4⁺ ヘルパー T 細胞は細胞性免疫を促進する Th 1 細胞と体液性免疫を活性化する Th 2 細胞に分類されており、Th 1 型免疫と Th 2 型免疫の間のバランス (Th 1 / Th 2 バランス) の破綻が免疫病発症の原因であるとする考え方が提唱されている。マウス、あるいはヒトにおいても、Th 1 / Th 2 バランスの偏向を決定する遺伝的な素質が存在するものと考えられている。しかし、生体内での Th 1, Th 2 細胞の機能発現メカニズムおよび機能分化を決定づける因子に関しては、未だ不明な点が多い。これらの点に関し、本研究は細胞性免疫エフェクター細胞による細胞障害機構、および BALB/c マウスの Th 2 型免疫への偏向の原因について解析した。さらに、Th 1, Th 2 細胞の移入による生体内 Th 1 / Th 2 バランスの体外からの操作を試みた。

まず、phorbol ester で長時間処理することによって誘導される protein kinase C (PKC) の down regulation を利用して、LAK 細胞の細胞障害作用発現における phorbol ester の感受性 PKC アイソフォームの関与について解析した。LAK 細胞は細胞障害エフェクター分子の放出、および Fas-Fas ligand の相互作用の 2 つのメカニズムによって標的細胞を破壊するが、前者が phorbol ester 感受性 PKC アイソフォームに依存적であるのに対し、後者は非依存적であることを明らかにした。

次に、免疫応答におけるマウス系統差に着目し、遺伝的な Th 1 / Th 2 バランスの調節因子を追求した。その結果、非 MHC 遺伝子によって制御される BALB/c マウスの IL-4 高産生能を明らかにし、この形質が遺伝的な BALB/c マウスの Th 2 型免疫への偏向に関わる可能性を示唆した。さらに BALB/c マウスの IL-4 産生細胞が、NKT 細胞とは異なる CD 4⁺ CD62L⁻ C d 45RB⁻ T 細胞であることを明らかにし、IL-4 産生能を有する細胞への機能分化が BALB/c マウスでは起こり、C57BL/6 マウスでは起こらないことが、生体内 Th 1 / Th 2 バランスの系統差となって現れている可能性を示唆した。

次に、Th 2 型の免疫応答に偏りやすい BALB/c マウスに in vitro で誘導した Th 1 細胞を移入し、BALB/c マウスが IFN- γ 産生、および DTH 反応発現という Th 1 型の免疫応答を起こすようになることを明らかにした。さらに、Th 1 細胞を移入してから 3 ヶ月後でも Th 1 型の免疫状態が持続していることを示し、細胞移入が生体内 Th 1 / Th 2 バランスの外部からの制御に有用な手段になることを示唆した。

本研究により、細胞性免疫の 2 つの細胞障害メカニズムの間には PKC アイソフォームに対する依存性に差があることを明らかにし、また、IL-4 産生能の差が Th 1 / Th 2 バランスの遺伝的な調節因子になることを示した。さらに、細胞移入により Th 1 / Th 2 バランスを制御し、Th 1 / Th 2 バランス不均衡に由来する免疫疾患の治療の可能性を示した。

よって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。